

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-241430

(43)Date of publication of application : 08.09.2000

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

G01N 11/02

(21)Application number : 2000-046377

(71)Applicant : COMMISS ENERG ATOM  
BIOMERIEUX SA

(22)Date of filing : 23.02.2000

(72)Inventor : FOUILLET YVES  
THERETZ ALAIN  
PERRIN AGNES

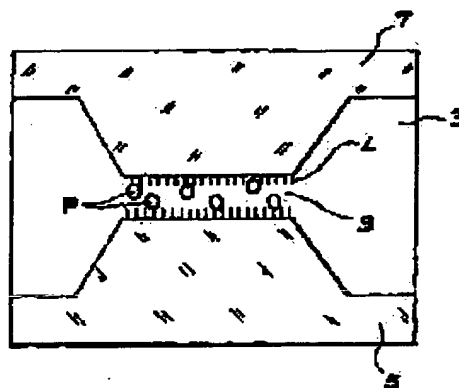
(30)Priority

Priority number : 99 9902288 Priority date : 24.02.1999 Priority country : FR

**(54) MEASURING METHOD FOR ANALYZING MATERIAL EXISTING IN SOLUTION****(57)Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To avoid usage of an expensive specific device, use an inexpensive conventional component elements, and to allow detection and/or quantitative analysis of an analyzing material by fixing and immobilizing the analyzing material to the inner surface of a flow passage entirely or partially having a reduced cross section.

**SOLUTION:** An analyzing material P to be measured is fixed and immobilized based on usage of a flow passage 3 entirely or partially having an adequate cross section. The fixing and immobilizing of the analyzing material P is performed in an entire part of a part or the reduced cross section of the flow passage 3, and may be performed in the entire flow passage. This fixing and immobilizing is performed by bringing the inner surface of the flow passage 3 into contact with solution or circulating the solution in the flow passage. Subsequently, change of load loss of the liquid circulating in the flow passage 3 is measured, the change occurs by fixing of the analyzed material P, and quantitative analysis of the analyzing material related to the amount of the fixed analyzing material may be performed by using a shown plot or a curve or by examination or simulation based on the used flow passage 3 and geometric data of the analyzing material P.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2000-241430  
(P2000-241430A)

(43) 公開日 平成12年9月8日(2000.9.8)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>  
G 0 1 N 33/543  
11/02

識別記号  
5 9 7

F I  
G 0 1 N 33/543  
11/02

データベース(参考)

5 9 7

審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2000-46377(P2000-46377)

(22) 出願日 平成12年2月23日(2000.2.23)

(31) 優先権主張番号 9 9 0 2 2 8 8

(32) 優先日 平成11年2月24日(1999.2.24)

(33) 優先権主張国 フランス (F R)

(71) 出願人 590000514

コミッサリア タ レネルジー アトミ  
ク  
フランス国パリ, リュ ドウ ラ フェデ  
ラシオン, 31-33

(71) 出願人 500077845

ピオメリュー・ソシエテ・アノニム  
フランス・69280・マルシ・レトワール・  
シュマン・ドゥ・ロルム (番地なし)

(74) 代理人 100064908

弁理士 志賀 正武 (外7名)

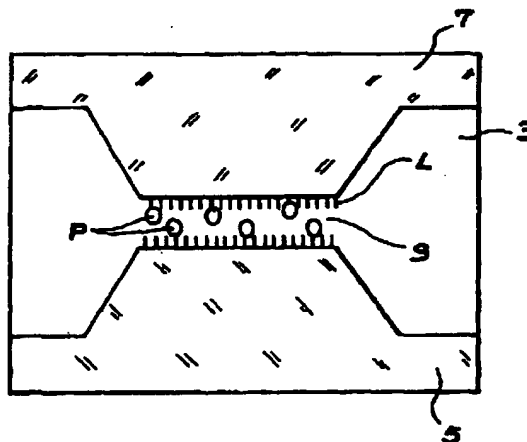
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 溶液中に存在する分析物の測定方法

(57) 【要約】

【課題】 非常に高価であり特別の装置の使用を避け、安価な価格で従来の構成要素を使用して分析物の検出及び/または定量が可能な、分析物の測定法の提供。

【解決手段】 a) その全てまたは一部に減少断面を有する流路の内部表面に分析物を固定及び不動化すること、及びb) 工程a) の間に上記流路の少なくとも減少断面部に固定及び不動化された分析物による、該流路内を循環する液体の負荷損の変化を測定することの工程を含むことを特徴とする、溶液内の分析物を測定する方法を提供すること。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) その全てまたは一部に減少断面を有する流路の内部表面に分析物を固定及び不動化すること、及び;

b) 工程a) の間に上記流路の少なくとも減少断面部に固定及び不動化された分析物による、該流路内を循環する液体の負荷損の変化を測定すること; の工程を含むことを特徴とする、溶液内の分析物を測定する方法。

【請求項2】 工程a) が、該流路の内部表面と該溶液を接触させること、または該流路内に該溶液を循環させることによって実施され、上記循環が少なくとも一つの順次的な停止を含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 負荷損の変化が、該流路の減少断面部のそれぞれの側に位置する二点間の一定の流速での、該方法の工程a) の実施前後の該流路における液体循環の圧力の差、または工程a) の前後の一定の圧力での流速の差を計測することによって測定されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項4】 上記液体が、該溶液の全てまたは一部であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項5】 上記液体が、該溶液とは異なる液体であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項6】 工程a) の前に、減少断面の壁が、分析物をそれ自体固定可能な少なくとも一つのリガンドで全てまたは一部皮膜されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項7】 リガンドの存在が、該流路の減少断面部のそれぞれの側に位置する二点間の、リガンド皮膜を実施する前後の該流路内を循環する液体に関する、一定の流速での圧力の差、または一定の圧力での流速の差を計測することを通して、負荷損の変化を測定することによって検出されることを特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項8】 分析物のそれより大きいサイズの分析物-支持体接合体を形成するための支持体物質と分析物の物理的または化学的反応を含み、この反応が、上記分析物が工程a) の前に該溶液中で遊離している場合、または該分析物が分析物-支持体接合体を形成するために工程a) の後に該流路の減少断面の内部壁に直接的または間接的に既に固定化されている場合のいずれかで生ずることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項9】 支持体物質が、分析物に対してそれ自体結合可能なリガンドを含むことを特徴とする請求項8記載の方法。

【請求項10】 支持体物質が、分析物に対して特異的なリガンドによって官能化されたラテックス粒子で作製されることを特徴とする請求項8記載の方法。

【請求項11】 工程a) とb) の間に少なくとも一つの該流路の洗浄工程を含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項12】 該流路の減少断面の最小の寸法 $T_c$ が、以下の式:

$$(T_c : 3) < T_A \text{ または } e < T_c$$

(式中、 $T_A$ は分析物-支持体接合体のようなまたはその形態で固定化された分析物のサイズを表し、または $e$ はリガンドの厚さを表す) で表されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項13】 上記液体が、該溶液の全てまたは一部であることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項14】 上記液体が、該溶液とは異なる液体であることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項15】 該流路の減少断面の最小の寸法 $T_c$ が、以下の式:

$$(T_c : 3) < T_A \text{ または } e < T_c$$

(式中、 $T_A$ は分析物-支持体接合体のようなまたはその形態で固定化された分析物のサイズを表し、または $e$ はリガンドの厚さを表す) で表されることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項16】 該流路の減少断面の最小の寸法 $T_c$ が、以下の式:

$$(T_c : 3) < T_A \text{ または } e < T_c$$

(式中、 $T_A$ は分析物-支持体接合体のようなまたはその形態で固定化された分析物のサイズを表し、または $e$ はリガンドの厚さを表す) で表されることを特徴とする請求項3記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明の主題は、溶液中に存在する分析物の測定方法である。より正確には、本発明はこの分析物を検出及び/または定量可能な方法に関する。該分析物は、化学的または生物学的物質である。

【0002】それ故、本発明は、例えば抗原、抗体、DNAまたはRNA配列、細菌、ウイルス、細菌断片等の測定のための、化学的または生物学的分析の領域における数多くの応用が見出される。

## 【0003】

【従来の技術】化学的または生物学的分析のための数多くの系が、反応生成物を形成するための適切な化合物と測定される分析物の反応、引き続きこの分析物の存在及び濃度を測定するための検出及び/または定量に基づいている。一般的に、この検出は、放射性活性または蛍光トレーサー、酵素または検出される反応物と反応するために加えられた添加化合物によって運ばれる他の物質のような標識を経てなされる。上記トレーサーの使用は、分析物の検出及び/または定量を確認するための特別な装置の使用を仮定する。

【0004】例えば原子間力顕微鏡 (AFM) を使用する構造観測法、磁力的方法、例えば静電容量変化を測定することによる電気的方法、及び視覚的方法のような他の検出及び定量法もまた、FR-A-2 758 884 (1) に記載

されているように使用可能である。

【0005】しかしながらこれらの方法は、場合により非常に高価である特別の装置を必要とするという欠点も有する。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は正確には、上記の装置の使用を避け、安い価格で従来の構成要素を使用して分析物の検出及び／または定量が可能な、分析物の測定法を提供することを試みる。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明に従って、溶液中の分析物の測定法は、以下の工程を含む：

a) その全てまたは一部に減少断面を有する流路の内部表面上に上記分析物を固定及び不動化すること、及び  
b) 工程a)の間に上記流路の少なくとも減少断面部に固定及び不動化された分析物による、該流路の内側を循環する液体の負荷損の変化を測定すること。

【0008】かくして本発明の方法は、工程a)の間、測定される分析物が固定及び不動化される、その全てまたは一部に適切な断面を有する流路の使用に基づく。

【0009】該分析物の固定及び不動化は、該流路の減少断面の少なくとも全てまたは一部でなされるが、それらは全流路で実施されてもよい。

【0010】この固定及び不動化は、該流路の内側表面と該溶液を接触させることによって（例えば浸漬によって）、または該流路内に該溶液を循環させることによってのいずれかでなされ、後者の循環はおそらく少なくとも一つの順次的な停止を必要とする。

【0011】引き続き工程b)の間、該流路内を循環する液体の負荷損の変化が測定され、上記変化は該分析物の固定から生じ、固定された分析物の量と関連する。

【0012】この分析物の定量は、前もって示されたプロットまたは曲線を使用して、あるいは使用される流路と分析物の周知の幾何学的データ（サイズ及び量）に基づく実験またはシミュレーションによって実施されてもよい。かくして該負荷損の値は、流路内に不動化された分析物の量、及び／またはこの分析物のサイズと関連する。

【0013】実験を通して、該流路の能力を較正するために以前になされた測定値に対して、本発明の方法において得られた測定値を対照することが可能である。

【0014】これらの方法の両者と共に、負荷損と不動化された分析物の量の間の関係を示すグラフをプロットすることが可能である。それ故、負荷損の簡単な測定を経て、本発明の方法の工程a)の間に該流路に不動化された分析物の濃度を定量することが可能である。

【0015】本発明に従って、該流路の減少断面のそれぞれの側に位置する二点の間で一定の流速で、本方法の工程a)の実施前及び実施後の該流路を循環する液体の圧力の差、または工程a)の前後の一定の圧力での流速

の差を計測することによって、負荷損の変化を測定することが可能である。

【0016】この測定のために使用される液体は、初期溶液（この場合工程a)及び工程b)は同時的または連続的である）の全てまたは一部、あるいはこの溶液とは異なる液体でもよい。

【0017】従来技術において、循環する液体での流路の負荷損の測定は、例えば粘度といった該液体の特定の特徵、及び引き続きその粘度を修正可能な特定の製品の含有量を測定するために使用された。例えば文献US-A-4964 847 (2)において、この測定は、血液中のパックした細胞容量を評価するために使用される。

【0018】このタイプの測定法は、分析物の検出及び定量が、適切な形態を有しさらに測定される分析物を固定可能である特性を有する、流路の壁への不動化を必要とする本発明の方法とは異なる。

【0019】この後者の特性は、該分析物を結合可能なリガンドを壁に固定することによって該流路に与えられてもよい。

【0020】この場合、該分析物の測定は、該流路に不動化された分析物－リガンド複合体を形成する、分析物とリガンドの間の認識反応を含む。

【0021】本発明の方法のこの実施態様において、工程a)の前に、減少断面の壁は、分析物に対してそれ自体固定可能な少なくとも一つのリガンドで全体または一部を皮膜される。

【0022】この場合、リガンドの存在は、該流路の減少断面のそれぞれの側に位置する二点の間での、リガンド皮膜を作製する前後の該流路の内側を循環する液体の、一定の流速での圧力の差、または一定の圧力での流速の差の計測を通じて、負荷損の変化を測定することによって検出可能である。

【0023】本発明の実施態様の一つの変形に従って、測定される分析物のサイズ、またはリガンドとこの分析物の反応を経て形成される複合体のサイズが、該流路の減少断面部において十分な負荷損を生ずるにはあまりに小さい場合、該分析物の物理的または化学的反応が、該分析物よりも大きなサイズの分析物－支持体接合体を形成するために支持体物質で付加的に実施され、この反応は、上記分析物が工程a)の前に溶液中で遊離している場合、または該分析物が分析物－支持体接合体を形成するために工程a)の後に該流路の減少断面部の内側の壁で直接または間接に既に固定されている場合のいずれかで行われる。

【0024】分析物と支持体物質の間の反応は、該流路に該溶液を加える前、または工程a)を実施する前、または該流路の減少断面部の壁に該分析物を固定した後、つまり工程a)の後だが工程b)の前で実施してもよい。

【0025】該分析物と支持体物質の結合を促進するた

めに、該支持体物質は一般的に、該分析物と結合可能な表面上のリガンドを含む。

【0026】本発明に従って、用語「分析物」は、いずれかの化学的または生物学的物質、特に遊離形態のいずれかの生物学的物質を意味する。分析物の説明として、引用され得る例は、細胞、細胞小器官、ウイルス及び細菌、抗体、抗体断片、抗原、ハプテン、レクチン、糖、リボ核酸及びデオキシリボ核酸、タンパク質、特にプロテインAまたはG、ホルモン、ホルモンレセプター、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、及び一般的に天然または合成の、または類似体の、あるいは上述のタイプの少なくとも二つの分子または高分子の会合から生ずるいずれかの分子または高分子である。引用され得る分子または高分子の会合の例は、以下に定義される分析物-支持体接合体である。

【0027】本発明に従って、用語「支持体物質」は、液体媒体内で分離形態で、ほとんどの場合制限的ではないが粒子形態で配置または分散した生物学的、ポリマー、有機、無機または金属製支持体のいずれかのタイプを意味する。

【0028】引用され得るポリマータイプの支持体物質の例は、ラテックス粒子のような乳化重合によって得られる粒子、またはより大きなサイズでグラフトポリマー、コポリマー及び当業者に周知の他の方法によって得られるポリマーの粒子である。

【0029】引用され得る金属製タイプの支持体物質の例は、コロイド状金、強磁性、フェリ磁性、常磁性、または超常磁性粒子であり、それらは、単独または合金形態の、鉄、あるいはコバルト、ニッケルまたは他のもののような他の金属を含む、磁性またはそうではない天然または合成ポリマーで皮膜されているまたはされていない。

【0030】引用され得る無機タイプの支持体物質の例は、シリカまたはケイ素、マイカ、ガラス及び／または石英を含む粒子である。

【0031】引用され得る生物学的タイプの支持体物質の例は、巨大タンパク質または遊離状態で測定される分析物よりも大きなサイズのものである。

【0032】用語「分析物-支持体接合体」は、いずれかの手段によって上述のような支持体物質上に不動化された上述のようないずれかの分析物を意味する。支持体物質上への該分析物の不動化は、単純な吸着作用、あるいは支持体物質の表面を修飾可能な化学的または物理的の反応を経て共有結合によって分析物の固定を可能にする方法、あるいはキレート化、あるいは支持体物質上に不動化されたリガンドを経た分子認識によって、及び当業者に周知の分析物を引き留めることが可能ないずれかの他の従来の手段によってなすことができる。

【0033】用語「リガンド」は、化学的または物理的結合を経て、分析物と複合体を形成可能な要素を意味す

る。

【0034】引用され得るリガンドの例は、抗体、抗体断片、抗原、ハプテン、レクチン、糖、リボ核酸、デオキシリボ核酸、特にプロテインAまたはGといったタンパク質、ホルモン、ホルモンレセプター、ビオチン、アビジンまたはストレプトアビジン、並びに一般的に天然または合成リガンド及び修飾リガンドの類似体であり、該類似体はリガンドと競合的であってもよい。

【0035】この開示の残りの部分で、用語「循環セル」は、減少断面部を有する流路で、該流路の内部で液体を通過させる少なくとも二つの導入及び排出管路を有する流路を含むいずれかのタイプの系を表すであろう。

【0036】用語「減少断面」は、該流路の残りの部分より一般的に狭められた断面を意味する。ある場合、全流路が、この減少断面を有してもよい。この減少断面の部分は、「制限部」とも称され、及び特定の分析物固定特性のため、以下では「活性領域」と称されるであろう。

【0037】かくしてこの活性領域は、分析物と結合可能なリガンドを固定している流路の壁から形成される。

【0038】これらのリガンドは、該壁の表面を修飾しリガンドの固定が可能な化学的反応（共有結合）または物理的反応（吸着）によるような、いずれかの手段によって該壁に固定される。

【0039】本発明に従って、該分析物の固定及び不動化が可能な流路の減少断面部は、各種の形状より成ってもよい。それは特に、流路がシリンダー形状であれば円形であり、液体循環が二つの平行な表面の間を水平型で循環する場合には長方形であってもよい。

【0040】該流路は、例えばポリマー、無機または金属タイプの材料といった各種の物質で作製されてよい。

【0041】引用され得るポリマー材料の例は、ポリスチレンベースポリマー、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリブタジエン、ポリプロピレン、または他の材料であり、単独またはコポリマーの形態でもよい。

【0042】引用され得る無機材料の例は、酸化ケイ素、窒化ケイ素、ケイ素、ガラス及び石英を含む。

【0043】本発明に従って、該流路の減少断面部は、測定される分析物のサイズに適合可能となるような寸法とする必要がある。

【0044】もし該流路が、不動化された分析物のサイズに対して大きいサイズであるならば、この分析物の存在は、負荷損の顕著な変化を導かないであろう。それ故、該分析物の検出または定量の何れも不可能であろう。

【0045】液体力学の理論は、一般的に減少断面を有する流路の部分の導入と排出の間の負荷損 $\Delta P$ が以下の等式で定義されることを示す：

$$\Delta P = KQ$$

式中、Qは液体の容量流量を表し、Kは流路の構造的

徴及び該液体の粘度に関する負荷損係数である。

【0046】それぞれの寸法に従って、該流路の壁上の分析物または分析物-支持体接合体の存在は、負荷損係数の変化を引き起こす。分析物または分析物-支持体接合体の寸法に近い流路の高さに関して、測定され得る負荷損係数の変化が得られる。

【0047】それ故、適切な条件の下で分析物の測定を実施するために、減少断面部が不動化分析物、または不動化分析物-支持体接合体のサイズに適合するサイズを有する流路が使用される。

【0048】好ましくは、該流路の減少断面の最小の寸法 $T_c$ は、以下のように表される：

$$(T_c : 3) < T_A \text{ または } e < T_c$$

式中、 $T_A$ は該流路の減少断面部の壁上の分析物-支持体接合体のようなまたはその形態の固定化分析物のサイズを表し、または $e$ はリガンドの厚さを表す。

【0049】該液体の循環が二つの平行な表面の間で生じる場合、 $T_c$ は二つの表面の間の距離を表す。シリンダー状の流路の場合、 $T_c$ は該流路の直径を表す。

【0050】分析物または分析物-支持体接合体のサイズは、該分析物が一つの分子または一つの生きた細胞であるので非常に小さい；例えば数百ナノメートル以上の小さい寸法の流路が必要である。

【0051】上記の寸法を有する流路は、マイクロエレクトロニクス、マイクロメカニクスで使用されるもののようなマイクロ成形加工法を使用して、及び例えばFR-A-2727648 (3)に記載された型の方法を使用して得ることができる。

【0052】本発明の方法は、各種の態様で実施することができるが、さらにもし必要であれば、工程a)と工程b)の間に少なくとも一つの流路洗浄工程を実施してもよい。

【0053】十分な容量の分析物、例えば細菌、ウイルスまたは細菌断片を測定するために使用され得る第一の実施態様に従って、該方法は以下の工程を必要とする：

- 1) 活性領域に分析物を固定するために、該流路の活性領域と分析物を含む溶液を接触させること、
- 2) この活性領域で反応しない部分を除去するために該流路を洗浄すること、及び
- 3) 該流路における負荷損を測定すること。

【0054】本発明の第二の実施態様に従って、小さいサイズの分析物を測定することを企図して、該方法は以下の工程を必要とする：

- 1) 初期溶液中で分析物-支持体接合体を形成するために、初期溶液中の分析物と支持体物質を反応させること、
- 2) 活性領域で分析物-支持体接合体を固定するために、該流路の活性領域と該溶液を接触させること、
- 3) 反応しない部分を除去するために該流路を洗浄すること、及び

- 4) 該流路における負荷損を測定すること。

【0055】本発明の第三の実施態様に従って、小さいサイズの分析物を測定することを企図して、該方法は以下の工程を必要とする：

- 1) 活性領域で分析物を固定するために該流路の活性領域と分析物を含む溶液を接触させること、
- 2) 反応しない部分を除去するために該流路を洗浄すること、
- 3) 該流路の活性領域で直接に分析物-支持体接合体を形成するために、支持体物質を含む溶液を該流路の活性領域に加えること、
- 4) 反応しない支持体物質を除去するために該流路を洗浄すること、及び
- 5) 該流路における負荷損を測定すること。

【0056】負荷損を測定するために大きな分子または生物学的細胞を含まない液体を使用することが好ましいが、それにも関わらず上述の液体を使用することも考慮され得る。

【0057】かくして、これら三つの実施態様の一つの変形例に従って、負荷損の測定に先立つ洗浄工程は省略され、この測定は、前の工程の間に加えられた溶液、つまり第一の実施態様における分析物溶液、第二の実施態様における分析物-支持体接合体溶液、第三の実施態様における支持体物質溶液を液体として使用することで行われる。

【0058】本発明に従って、該流路の内部表面上の化学的または生物学的皮膜生成物の存在を測定するために、同じ基本的原理、即ち流路に不動化された生成物によって生じる負荷損の測定を使用することも可能である。

【0059】かくして、本発明のさらなる目的は、流路の内部表面上の化学的または生物学的皮膜の存在を測定するための方法であり、該方法は以下の工程を含む：

- 1) 該流路に循環液体を配置すること、
- 2) 該流路内の上記液体の負荷損を測定すること、及び
- 3) 該流路内の皮膜の存在または不存在を、測定された負荷損に基づいて測定すること。

【0060】この方法は、液体が実際に、本発明の方法を使用して分析物を測定することを企図した流路の活性領域内に固定され不動化されたかどうかを確認するために特に有用である。

【0061】この後者の場合、該流路の寸法は明らかに、皮膜によって生じる負荷損を測定するのに適していることが必要である。

【0062】好ましくは、該流路部分の最小の寸法 $T_c$ は、以下のように表される：

$$(T_c : 3) < e$$

式中、 $e$ は皮膜の厚さを表す。

【0063】本発明の他の特徴及び利点は、以下の説明を読むことでより明らかとなり、以下の記載は添付され

た図面を参考にして明白に説明の目的で与えられ、非制限的なものである。

【0064】

【発明の実施の形態】図1において、縦断面斜視図は、測定される分析物を含む溶液を循環するために使用されるセルを示す。

【0065】このセル(1)は、平行に配置されたセルのベースプレート(5)と上部プレート(7)の間に循環流路(3)を含み、プレート(5及び7)は、プレート(5及び7)によって形成された二つの平行な平面の間で閉ざされた流動領域によって形成された循環流路(3)及び減少断面部(9)を形成するように製造される。この流動領域(9)は、該セルの活性領域を形成する。ベースプレート(5)は、溶液を閉ざされた流動領域(9)を通じてセルを通過して循環可能なように、導入口(11)及び排出口(13)の二つの開口を含む。

【0066】例として、このセルは以下の寸法を有することができる：閉ざされた流動領域(9)において1 $\mu$ mの高さ(h)、閉ざされた流動領域(9)の2mmの長さ(l)、500 $\mu$ mの開口(9及び11)の直径(d)、流路(3)の5mmの長さ(L)。このセルは、二つのケイ素基層(5及び7)を用いた顕微技術法を使用して作製し得る。下部基層(5)において、開口(9及び11)は、レーザーエッチング、プラズマエッチングまたは他の方法によって作製できる。上部基層(7)において、閉ざされた流動領域は、エッチング法を使用して範囲を定めることができる。

【0067】次いで二つの基層を、従来の直接的Si-Si接着法を使用して組み立てることができる。

【0068】図2は、必要とされる測定を実施し、図1のセルにおいて溶液を循環可能な設備を示す。

【0069】この場合、図1のセル(1)は、セルホルダー(15)、シリンジプランジャ(17)、ゲートA、B、C、D及びEを備えた管路のネットワーク、一つまたは二つの圧力センサー(19及び21)、並びに

試験される溶液、リンス溶液または負荷損を測定するための液体を含む容器(23)と連結されている。該管路は、該設備が真空(ゲートA)または大気圧(ゲートB)に配置されるようにゲートを備えている。

【0070】この設備において、セル(1)は、セルホルダー(15)に接合され、またはクランプ機構を経てセルホルダーに固定される。それぞれの場合において、該設備は完全に十分に密封されなければならない。シリンジプランジャ(17)は、セルにおいて及び容器(23)からサンプル溶液に対して制御された流速を維持するように使用される。負荷損の測定は、循環セル(1)の導入口(11)及び排出口(13)のそれぞれに連結された二つの圧力センサー(19及び21)を使用して実施される。第二の圧力センサー(21)は、該セルホルダーに、大気圧のような基準圧力を導く場合には必要ではない。

【0071】正確な測定値を得るために、該系は液体で完全に充填されることが必要である。該セル中の断面水圧は非常に小さく、気泡は負荷損の測定を妨げるかなり顕著な毛管力を生じる。測定チャンバーに閉じ込められたままである気泡の形成を除去するため、循環系に配置される溶液は、脱気される必要がある。

【0072】同じ結果は、最初の充填工程の前に真空中に該設備を配置し、開始操作の前に該溶液を脱気することによって、図2に示された設備で達成されてもよい。

【0073】本発明の方法を実施するために、測定される分析物溶液及びリンス溶液のような異なる溶液が、セルにおいて循環されることが必要である。セルホルダー及びゲートC、D及びEの形状は、各溶液を換える際に全ての管路の容易な排水を可能にし、その一方で該設備中での気泡の出現を制限するものである。

【0074】以下の表は、図2に示された設備を使用した操作態様の例を記載する。

【0075】

【表1】

表

フェーズ	記載	ゲート				
		(O=開、C=閉)				
第一の溶液の注入		A	B	C	D	E
フェーズ1	真空中に設備を配置	O	C	O	O	C
フェーズ2	水圧回路及びセルを充填させる	C	O	O	O	C
フェーズ3	シリンジ内に一定量の溶液を吸引	C	O	O	O	C
フェーズ4	セル中への溶液の循環	C	O	C	C	O
引き続き溶液の注入						
フェーズ5	溶液の交換（または容器の交換）	O	C	C	C	O
フェーズ6	フェーズ3及び4の繰り返し					

【0076】この操作態様のフェーズ1の間、セル及び管路ネットワーク設備を真空中に配置し、容器(23)の溶液をゲートA、C及びDを開きゲートB及びEを閉

じることによって脱気する。

【0077】この操作の後、フェーズ2は、ゲートA及びEを閉じゲートB、C及びDを開くことによって水圧



回路及びセルを充填させることより成る。

【0078】フェーズ3の間、一定量の溶液が、ゲートB、C及びDを開きゲートA及びEを閉じて、シリンジを可動することによってシリンジ(17)内に吸引される。

【0079】引き続きフェーズ4の間、該溶液は、シリンジ(17)を押し出し、ゲートB及びEを開きゲートA、C及びDを閉じることによって、該セル内に循環せられる。次いで圧力センサー(19)によって、該セル中の負荷損を測定可能である。新たな分析を実施するために、または設備をリンスするために、ゲートA及びEを開きゲートB、C及びDを閉じることで容器(23)は交換できる。次いで上述のようにフェーズ3及び4の操作態様を続けて新たな分析を実施できる。

【0080】このセルにおいては、閉ざされた流動領域(9)に相当する活性領域を、その壁が分析物または検出される分析物のリガンドを固定可能なように処理した。

【0081】以下に与えられた実施例は、セルの活性領域のケイ素壁上に捕獲抗体で作製されたリガンドを固定するために使用される処理、及び捕獲抗体によって不動態化可能な他の抗体で作製された分析物を測定するためのこのセルの使用を説明する。

【0082】

【実施例】実施例1：閉ざされた流動領域の壁の官能化  
この操作は、セルを形成するために結合する前の、基層(5及び7)で実施することができる。

【0083】この目的のために、構築物は2時間精製水中で煮沸され、次いで不活性化窒素環境または真空中で乾燥される。構築物は、基層支持体(5及び7)で作製され、処理を必要としない表面は、マスクされてもよい。得られた構築物は、トルエン中にメチル-n-オクタデシルジエトキシシランの2%溶液のようなシラン溶液を含むフラスコ中に配置され、それらは1時間還流の下でこの溶液中に保持される。この方法において、特に閉ざされた流動領域(9)のための内部シラン化表面が得られる。1時間の超音波処理でシラン化を実施することも可能である。この操作の後、該構築物をアセトン中で数回すすぎ、次いで120℃で乾燥する。シラン化の後、使用されているいずれかのマスクを除去可能である。

【0084】このシラン化工程は、抗体の吸着を可能にする疎水性表面を生じさせることによってシリカの表面特性を修正可能である。

【0085】もしマスクが使用されたならば、図3及び6に従って処理された表面が得られる。もしマスクが使用されないのであれば、次いでこれらの処理された表面は、図8及び9に示された構造を有する。

【0086】流路を形成するための基層(5及び7)の結合は、特に結合の前にいずれかのマスクの除去を可能

にするために、シラン化の後、またはシラン化の前のいずれかでなされる。

【0087】実施例2：閉ざされた流動領域の壁上へのリガンドの固定

この実施例において、リガンドは捕獲抗体で作製される。

【0088】この固定化操作を実施するために、セル及び管路設備は最初に水で、次いでエタノールですすぎ、乾燥される。容器(23)に対してPBS緩衝液(50 mMリン酸塩、0.15 M NaCl、pH7.4)中に40 mg/mlの割合で抗フェリチンモノクローナルマウス抗体を加え、次いで設備全体は、ゲートA、C及びDを開きゲートB及びEを閉じて真空中に配置される。次いで特に活性領域(9)で気泡の形成が生じないように、セルを即時に充填させるために、ゲートB、C及びDを開き、ゲートAを閉じ、ゲートEは閉じたままにして大気圧に瞬時に戻す。気泡が存在しないことは、領域(9)の内部を顕視化可能な赤外線顕微鏡によって確認する。抗体溶液をシリンジ(17)を使用して容器(23)から汲み上げ、次いでゲートA、C及びDを閉じ、ゲートB及びEを開いてシリンジプランジャ(17)を使用して制御された流速で、該抗体溶液をセル内に注入する。シリンジ内の過剰な抗体溶液を除去し、容器(23)を交換した後、上述の表のフェーズ3及び4を繰り返すことによって、0.5% Tween 20を含むPBSリンス緩衝液で該設備をすすぐ。

【0089】図3は、捕獲抗体で作製されたリガンド(L)で皮膜された循環セルの活性領域(9)の縦方向の切断面を示す(マスクが使用される場合の特定のケースである)。

【0090】リガンド(L)の固定化は、酵素：アルカリホスファターゼ(AKP)で標識された抗マウスヤギ抗体を使用する固相酵素免疫検定法(ELISA)によって確認される。この酵素は、405ナノメートルで分光光度計によって測定される発色生成物を与える特異的な基質、p-ニトロフェニルホスファート(pNPP)と反応する。

【0091】図4は、捕獲抗体(陽性コントロール)で皮膜された壁で得られた405 nmでの光学濃度ODを示す。比較のために、この図は、捕獲抗体の吸着工程を実施されていないシリカ化壁で得られた光学濃度も示す。

【0092】この図は、セルの活性領域(9)で捕獲抗体が存在することを確認する。

【0093】捕獲抗体で処理されたセルにおいて得られた負荷損を、捕獲抗体溶液での処理の前に該セルで得られた負荷損と比較することによって、本発明の方法でこれらの捕獲抗体の存在を測定することも可能である。

【0094】理論に従って、広さb及び長さlで流速Qに対して、高さhの閉ざされた流動領域(9)におい

て、動粘度 $\mu$ を有する液体の流動の間の負荷損 $\Delta P$ は、以下の式によって定義される：

$$\Delta P = \frac{6 \mu l}{b h^3} Q$$

かくして、セルについては：

$$h = 4 \mu m$$

$$b = l = 2 mm$$

であり、20℃で粘度 $\mu$ が $1.0^{-3} kg/ms$ の液体の場合、結果として $\Delta P (10^{-1} MPa) = 16 Q (\mu l/分)$ である。

【0095】本発明のセルにおける $\Delta P$ と $Q$ の間の関係の直線性は、PBS-Tween緩衝液を異なる流速でセル内を循環させることによって確認された。

【0096】図5は、流速 $Q (ml/分)$ に対する該セルにおける負荷損 $\Delta P (MPa)$ の変化を示し、この関係の直線性を確認する。

【0097】実施例3：抗マウスヤギ抗体でなされた分析物の測定

この実施例において、上述の実施例で調製されたセルが使用され、該セルは活性領域(9)の壁が、捕獲抗体、抗フェリチンモノクローナルマウス抗体で作製されたリガンド(L)で皮膜されている。

【0098】この測定については、最初に分析物のサイズを増大するために分析物-支持体接合体が形成される。この目的のため、直径 $1 \mu m$ のラテックス粒子が支持体として使用され、それらは1:100の希釈でPBS-Tween中に分析物-支持体接合体を形成するために、抗マウスヤギ抗体と反応を生じる。抗マウスポリスチレン抗体ラテックス粒子は、Polyscience Inc. USA社から商品番号17694のものを購入する。

【0099】該抗体で官能化されたラテックス粒子の溶液は容器(23)内に配置され、次いで捕獲抗体及び洗浄緩衝液について上述のように $0.3 ml/分$ の流速でセル内に注入される。

【0100】この方法において、図6に示された構築物が得られる。この図において、セルの活性領域(9)の壁に固定されたリガンド(L)が、官能化ラテックス粒子(P)(分析物-支持体接合体)に結合し、それは該セルの活性領域(9)を部分的に塞いでいるのが解る。次いでTween 20を含むPBS緩衝液を、 $0.3 ml/分$ の流速でセル内を循環させ、負荷損が、圧力センサー(19)によって測定される。

【0101】 $0.16 MPa$ の値が得られ、一方で陰性コントロール、つまり活性領域にリガンドを含まないセルについて、官能化ラテックス粒子の溶液を注入した後、負荷損は $0.03 MPa$ である。これは、捕獲抗体によって形成されたリガンドを含まないセルの活性領域の壁上にラテックス粒子/抗マウス抗体接合体を固定できないという事実によって説明される。

【0102】図7は、実施例2(工程1及び2)及び3の負荷損、並びにこれらの二つの実施例における陰性コントロール(捕獲抗体なし)の負荷損を示す。

【0103】工程1は、抗体の注入の間セルから上流側で測定された負荷損に関する。工程2は、抗体の固定化の後PBS/Tween 20洗浄溶液でなされた測定値に相当する( $0.03 ml/分$ の流速)。実施例3において、測定は、 $0.03 ml/分$ の流速でPBS-Tween 20でなされる。

【0104】実施例2で示されたケースにおいて(工程1及び2)、捕獲抗体の固定化のための負荷損のわずかな増大に注意すべきである。実施例3に示されたケースにおいて、負荷損の増大は顕著である。また、工程1及び2の結果に従って、溶液を交換する場合、負荷損の増大は存在しないことに注意すべきである。

【0105】それ故本発明は、循環セルの内部の抗体-ラテックス粒子接合体の独特の不動化が、活性領域9の高さの減少を生じ、それが一定の流速での負荷損の増大を導くことより成る。

【0106】実施例3における陰性コントロールに関して、実施例3のリンス工程の間負荷損の変化は観察されない。該ラテックス粒子は、この活性領域において引き留められないので、活性領域9の高さを変更しない。

【0107】図8及び9は、循環流路(3)の全表面が、リガンド(L)で皮膜され(図8)、次いで分析物-支持体接合体の粒子(P)で皮膜される(図9)セルを説明する。これは、該流路の内部表面の全てが、マスクを使用することなく実施例1のように官能化され、次いで実施例2のようにリガンドの固定が引き続き、それから実施例3のように分析物の測定がなされるケースに関する。

【0108】かくして、粒子(P)は、流路(3)及び閉ざされた領域(9)で見出される。この存在は、測定される負荷損に何れの影響も有さず、実施するのがずっと容易であるため、本発明の好ましい実施態様を形成する。

【0109】(参考文献)

[1]: FR-A-2 758 884

[2]: US-A-4 964 847

[3]: FR-A-2 727 648

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、本発明の方法を実施するために使用される循環セルの縦断面斜視図を示す。

【図2】 図2は、本発明の方法を実施し、負荷損の測定を実行するための図1のセルを含む設備を示す図である。

【図3】 図3は、リガンド皮膜を含む図1のセルの活性領域の縦断面図である。

【図4】 図4は、図1のセルの活性領域上の捕獲抗体の固定を説明する棒グラフである。

【図5】 図5は、流路における流速 $Q$  (ml/分) に対する流路における負荷損 $\Delta P$  (MPa) の変化を示すグラフである。

【図6】 図6は、リガンド上の分析物の不動化の後の、図1のセルの活性領域の縦断面図である。

【図7】 図7は、固定化物質に対するセルの活性領域における負荷損 $\Delta P$  (MPa) の変化を説明する線図である。

【図8】 図8は、流路全体にリガンドLの皮膜を含むセルの縦断面図を示す。

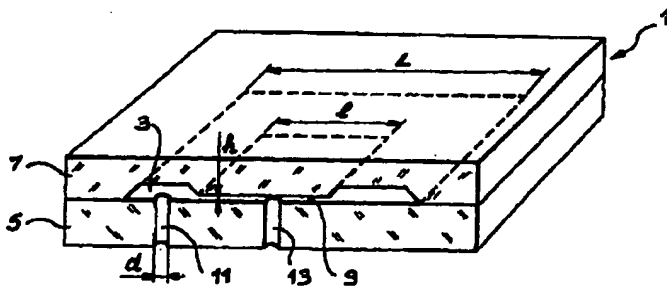
【図9】 図9は、リガンドL上の分析物-支持体接合体の不動化の後の、図8のセルの縦断面図である。

【符号の説明】

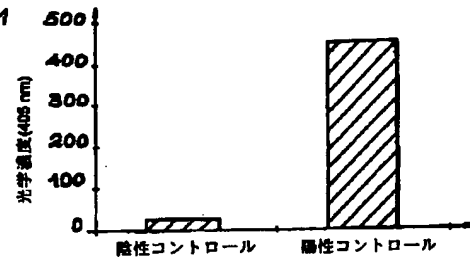
- 1. セル
- 3. 流路
- 5. 下部基層

- 7. 上部基層
- 9. 減少断面
- 11. 導入口
- 13. 排出口
- 15. セルホルダー
- 17. シリンジアランジャ
- 19. 圧力センサー
- 21. 圧力センサー
- 23. 容器
- A. ゲート
- B. ゲート
- C. ゲート
- D. ゲート
- E. ゲート
- L. リガンド
- P. 分析物-支持体接合体

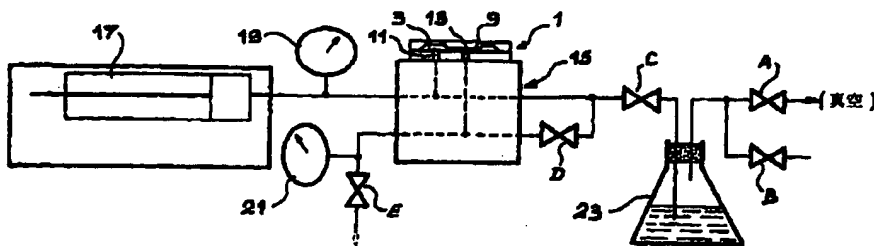
【図1】



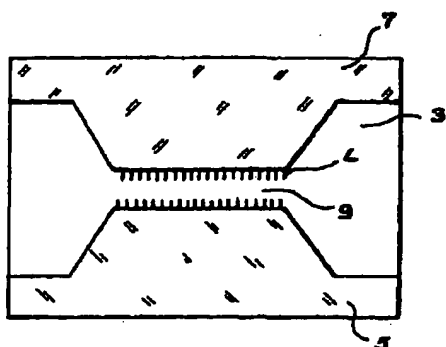
【図4】



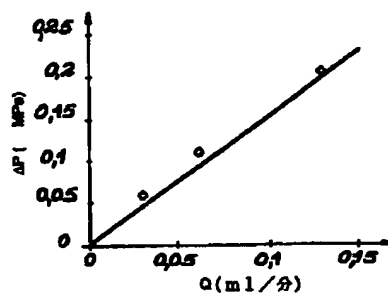
【図2】



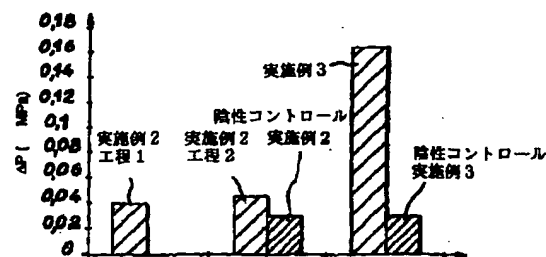
【図3】



【図5】

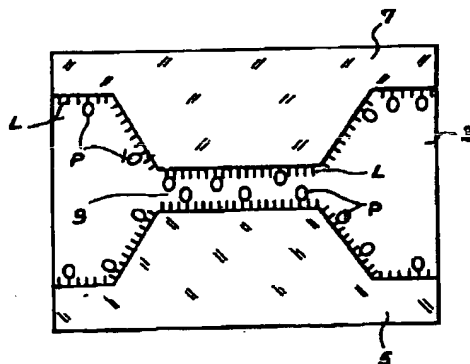
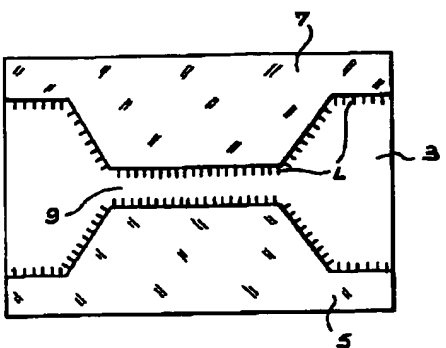


【図7】



【図9】

【図8】



フロントページの続き

(72)発明者 イヴ・ファイエ  
フランス・38340・ヴォルップ・ル・シュ  
ヴァロン・ドゥ・ヴォルップ・シュマン・  
デ・カリエール・17

(72)発明者 アラン・テレ  
フランス・69130・エキュリ・リュ・デ  
ユ・ドメヌ・20

(11) 00-241430 (P2000-ch;30

(72)発明者 アニエス・ペラン  
フランス・69007・リヨン・プラス・デ・  
バヴィヨン・30